Konjugation von Dehydroepiandrosteron in Blut und Plasma bei Mensch und Meerschweinchen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Alimamy Wurie

Saarbrücken

1971

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus der Endokrinologischen Abteilung am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes

(Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Zimmermann)

KONJUGATION VON DEHYDROEPIANDROSTERON IN BLUT UND PLASMA BEI MENSCH UND MEERSCHWEINCHEN

D I S S E R T A T I O N S A R B E I T

zur Erlangung der Doktorwürde

DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Alimamy Wurie

geb. am 31.7.1928

Referent: Prof. Dr. G.W. Oertel

Dekan: Prof. Dr. H. Kulenkampff

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 10. 3. 1971 abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 3

II. Methodik 12

III. Ergebnisse 18

IV. Diskussion 21

V. Zusammenfassung 26

VI. Schrifttum 27

I. Einleitung

Ein Hormon ist eine Substanz, die in spezifischen Gewebsstrukturen gebildet und auf dem Blutwege an ihren Wirkungsort befördert wird. Dieses Prinzip gilt auch für die Steroidhormone, deren Bildungsstätten die Nebennierenrinde und die Gonaden sind. Ihre Angriffspunkte sind in vielen Fällen hypothetisch oder unbekannt. Im Falle der anabol wirksamen Androgene ist der Rezeptor wohl in den Strukturen der Transmitter-RNS im Eiweißaufbausystem zu suchen. Für die Östrogene kann als gesichert angesehen werden, daß sie am Endometrium im Sinne der gesteigerten Proliferation die Nucleinsäuresynthese zu stimulieren vermögen, während in der zweiten Zyklushälfte die Wirkung von Progesteron diesen Effekt aufzuheben vermag (14, 27, 32, 33).

Eine Hochrechnung der verschiedenen Plasmakonzentrationen auf das Gesamtblutvolumen läßt als Nebenbefund den Schluß zu, daß dem Blut neben der Aufgabe des Transportes eine gewisse Speicherfunktion zuzuschreiben ist. Auf der anderen Seite führt das Blut Hormone bzw. in überwiegendem Maße Abbauprodukte der Hormone den Ausscheidungsorganen zu. Als sol-

ches ist in erster Linie die Niere zu nennen; daneben kommt der Sekretion durch die Galle ebenfalls eine wesentliche Bedeutung zu. Eine Reihe von Steroiden können hierdurch über die Faeces eliminiert werden, wie dies für die Östrogene in quantitativ bedeutender Hinsicht vermutet wird. Andererseits stellt die Ausscheidung von Steroiden über die Galle den ersten Schritt eines enterohepatischen Kreislaufes dar. Dieser enterohepatische Kreislauf konnte für eine Reihe von C 19-Steroiden nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich keineswegs um einen reinen Abbaumechanismus, sondern im Zuge einer weitgehenden Rekonjugation um eine gewisse Regenerierung von Steroiden. Wesentlich scheint hierbei, daß über einen derartigen zweiten Kreislauf ein großer Pool von Steroiden zur Verfügung steht, aus dem gewisse Schwankungen der Plasmakonzentrationen biologisch aktiver Steroide theoretisch abgefangen werden können (10, 11, 15).

Nicht nur bei Harnanalysen, sondern auch bei Plasmauntersuchungen fiel schon früh auf, daß ein und dasselbe Steroid in verschiedenen Formen vorliegen kann: Zum Teil handelt es sich dabei um freie Steroide, zum Teil aber um sogenannte Konjugate, bei denen das Steroid ester- oder ätherartig an verschiedene Säuren gebunden ist. Lange Zeit war man der Ansicht, daß die Bindung mehr oder minder hydrophober Ste-

roide an Schwefel- oder Glucuronsäure lediglich der Ausscheidung seitens der Niere diene und daß diese Konjugate biologisch und metabolisch inaktiv seien. Bestärkt wurden diese Annahmen durch die Tatsache, daß im Urin praktisch keine freien Steroide nachgewiesen werden konnten. Für die Steroidglucuronoside einer ätherartigen Verbindung trifft dies auch in großen Zügen zu, wenn auch einschränkend bemerkt werden muß, daß z.B. Testosteronglucuronosid durchaus noch biologisch aktiv ist, wenn auch 10mal geringer als freies Testosteron (28).

Ganz anders liegen dagegen die Verhältnisse bei den Sulfokonjugaten. Während die biologisch und metabolisch aktiven Corticosteroide hauptsächlich in freier Form vorliegen, sind die adrenalen Androgene, wie etwa das Dehydroepiandrosteron (DHEA), im Plasma fast ausschließlich an Schwefelsäure gebunden. Diese Koppelung findet man auch in Gewebsextrakten der Nebennierenrinde (3, 5). Zahlreiche Autoren haben sich mit der Biogenese und mit dem Metabolismus sulfokonjugierter Steroide auseinandergesetzt und unter Zuhilfenahme doppelt markierter Steroidkonjugate herausgefunden, daß die metabolischen Schritte, die man bei freien Steroiden nachgewiesen hatte, auch an konjugierten Steroiden vonstatten gehen kön-

nen und zwar ohne Aufspaltung der Konjugatbindung (sog. direkter Metabolismus). In einigen Fällen konnte sogar ein bevorzugter Metabolismus konjugierter Steroide herausgearbeitet werden, wie dies etwa für die Bildung von Östrogenen aus DHEA-Sulfat und Androstendion-enol-Sulfat zutrifft (12, 25, 26). Aber nicht nur quantitative sondern auch qualitative Unterschiede hinsichtlich des Metabolismus lassen sich je nach Vorliegen eines Steroids in freier oder konjugierter Form erkennen. So zeigte sich bei einer Leberperfusion beim Meerschweinchen, daß Testosteron zusammen mit einer beträchtlichen Menge an Androstendiol nur bei Durchströmung mit freiem DHEA gebildet wurde, nicht dagegen, wenn DHEA in konjugierter Form vorlag (29, 34).

Hinsichtlich der Sulfokonjugate ergeben sich aber noch weitere Probleme. Es existieren nämlich zwei grundverschiedene Formen. Bei der einen ist das Steroid lediglich mit Schwefelsäure verestert, bei der zweiten ist die zweite OH-Gruppe der Schwefelsäure ebenfalls verestert und zwar mit einem Diglyzeridrest. Diese Konjugationsform wurde erstmalig von OERTEL isoliert und beschrieben und in Analogie zu den Phosphatiden Sulfatidylsteroide oder kurz Sulfatid genannt (17, 24).

Zur Veranschaulichung sei in Abbildung 1 das DHEA-Sulfatid schematisch dargestellt.

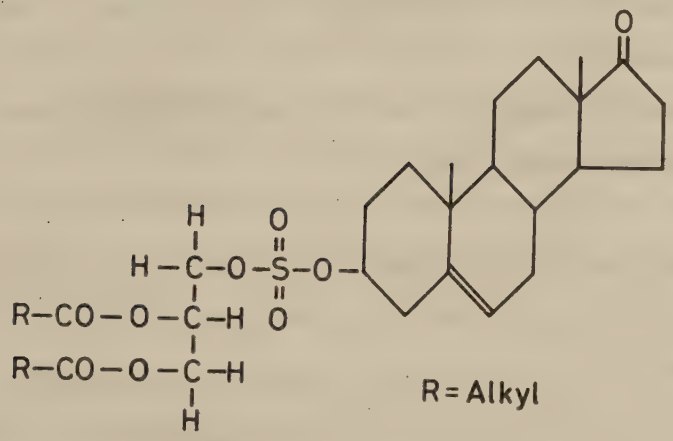

Abbildung 1: Dehydroepiandrosteron-Sulfatid (DHEA-Sulfatid)

Im Gegensatz zu den wasserlöslichen Sulfaten gehören die Sulfatide auf Grund ihres Diglyzeridrestes zu den lipophilen Stoffen. Da es sich bei den Sulfatiden um sehr labile Substanzen handelt, die bei der analytischen Aufarbeitung leicht in Steroidsulfate und Diglyzeridreste zerfallen, ist ihre Isolierung und Bestimmung relativ schwierig. Trotzdem gelang es, in

einer Reihe von Arbeiten eindeutige Beweise für das Vorliegen derartiger Substanzen zu erbringen (16, 18, 19, 20). Die quantitative und qualitative Analyse hochgereinigter Sulfatide ergab folgende Zusammensetzung:
1 Mol Steroid + 1 Mol Schwefelsäure + 1 Mol Glyzerin + 2 Mol Fettsäuren.
Auch das Verteilungsmuster der eingebauten Fettsäuren konnte herausgefunden werden (21).

Auf Grund des lipophilen Charakters der Sulfatide legte ihr Vorkommen im Plasma eine Bindung an Eiweißkörper nahe. Ein entsprechendes Verteilungsmuster innerhalb der Serumeiweißfraktion konnte schließlich an Hand von Untersuchungen mit radioaktiv markierten Steroidsulfatiden herausgearbeitet werden (22). Neben der Veresterung mit Schwefelsäure sind analoge Substanzen mit Phosphorsäure isoliert worden (23).

Nach der Isolierung von Sulfatiden aus dem Plasma gelang es, diese Konjugate auch in Geweben nachzuweisen. So fanden sich in der Nebennierenrinde lipophile Steroidkonjugate, die als solche auch in das Blut sezerniert werden (30). Eine sehr bedeutsame Bildungsstätte für Sulfatide stellt die Leber dar, wie dies an Hand von Perfusionsversuchen an der Meerschwein-

chenleber und bei Untersuchungen über den enterohepatischen Kreislauf zum Ausdruck kam. Die Bildung von Sulfatiden aus Sulfaten im Lebergewebe ist vornehmlich an die Mitochondrien gebunden. Die Präparation dieser Zellstrukturen in der Ultrazentrifuge stellt zwar eine methodische Erschwernis bei der biosynthetischen Herstellung von Sulfatiden aus Sulfaten dar, hat aber gegenüber der Verwendung von Vollhomogenaten den Vorteil, daß weniger Metaboliten gebildet werden; bisher ist nämlich die chromatographische Trennung verschiedener Metaboliten in Form der Sulfatidylkonjugate noch nicht zufriedenstellend gelungen.

In einer Reihe von Arbeiten, in denen Beziehungen zwischen dem reticuloendothelialen System (RES) und der Konjugation von Hydrocortison untersucht wurden, zeigte es sich, daß die Bildung von Sulfatiden auch im RES vorgenommen wird, insbesondere dann, wenn man das RES mit Nucleinsäuremetaboliten aus Gewebsextrakten stimuliert. Bei diesen Gewebsextrakten handelt es sich um Präparate vornehmlich aus der Milz. Daß bei der Anwendung derartiger Extrakte tatsächlich eine Stimulierung des RES hervorgerufen wurde, konnte auf Grund von analogen Versuchen mit pyrogenen Reizstoffen bestätigt werden (7, 8).

Zur Untersuchung der Sulfatide bot sich in erster Linie das DHEA an, da es einerseits das quantitativ im Plasma dominierende C 19-Steroid ist, andererseits fast ausschließlich als Sulfokonjugat vorliegt. Zur Biosynthese sei kurz vermerkt, daß der Weg von Cholesterin über Pregnenolon und 17-OH-Pregnenolon zu DHEA durch in zwei Stufen verlaufende oxydative Abspaltung der Seitenkette und Einwirken einer Isomerase, die die Doppelbindung in Ring A zwischen C 4 und C 5 beim Cholesterin in eine Doppelbindung in Ring B zwischen C 5 und C 6 verlagert, als gesichert angesehen werden kann. Jeder dieser biosynthetischen Schritte ist auch in sulfokonjugierter Form möglich. Außerdem wurde ein weiterer direkter Weg von Cholesterin zu DHEA angenommen (4).
Die Abbildung 2 gibt diese Schritte schematisch wieder.

An Hand von Perfusionen der Meerschweinchenleber mit DHEA und seinen Konjugaten sollten die in vivo-Verhältnisse der Konjugation seitens der Leber überprüft werden. Es wurde dabei Tritium-markiertes DHEA bzw. dessen Konjugat einer bestimmten Menge heparinisierten Vollblutes beigegeben. Sozusagen als Nebenbefund traten dabei bereits im Infusatblut Metaboliten und Konjugate auf: Nach Zugabe von freiem DHEA und DHEA-Sulfat ließ sich aus dem Infusatblut eine signifikante

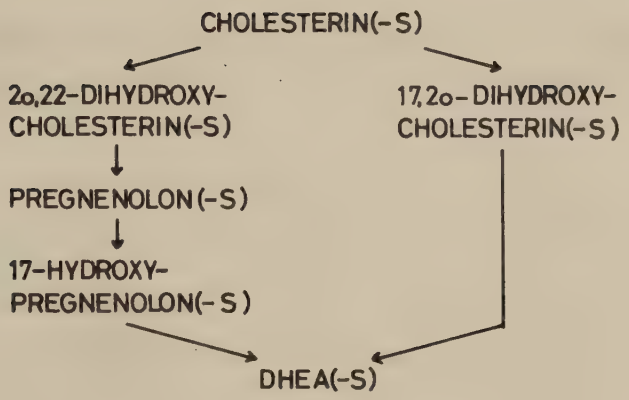

Abbildung 2: Biosyntheseschema von Dehydroepiandrosteron (DHEA).

Menge an DHEA-Sulfatid isolieren.

Die Möglichkeit einer Konjugation von Steroiden seitens des Blutes wurde schon verschiedentlich geäußert und soll im Folgenden für den speziellen Fall des DHEA untersucht werden und zwar bei Mensch und Meerschweinchen.

II. Methodik

Material

10 ml frischen Vollblutes von Mensch und Meerschweinchen wurden mit 2 ml 3,8 %iger Natriumcitratlösung versetzt und mit 7 α -^{3}H-Dehydroepiandrosteron (The Radiochemical Center, Amersham, England) (spezifische Aktivität: 18.300 mC/mMol) 30 Minuten bei 37 ^{o} C inkubiert. In gleicher Weise wurde mit entsprechenden Mengen Citratplasma verfahren. Blut bzw. Plasma von menschlichen Versuchspersonen wurde außerdem mit 7 α-^{3}H-Dehydroepiandrosteron-Sulfat inkubiert (spezifische Aktivität: s.o.). Die einzelnen Versuche wurden jeweils doppelt angesetzt (siehe Tabelle I).

Nach erfolgter Inkubation wurde das Vollblut zentrifugiert und das derartig gewonnene Plasma in gleicher Weise wie die Plasmaproben aufgearbeitet.

Tabelle I: Menge und spezifische Aktivität der eingesetzten Steroide.

		7α-^{3}H-DHEA	spezifische Aktivität
Meerschweinchen	Blut	0,4	18 300
	Plasma	0,4	18 300
Mensch	Blut	0,08 - 0,1	18 300
	Plasma	0,08 - 0,1	18 300
		7α-^{3}H-DHEA-Sulfat	
Mensch	Blut	0,06	18 300
	Plasma	0,06	18 300

Chemische Aufarbeitung (5, 24)

Die freien Steroide ließen sich mit 3mal 2 Volumen Chloroform extrahieren. Das Restplasma wurde zum Zweck der Eiweißausfällung mit 8 Volumen Äthanol-Aceton (1:1, v/v) und anschliessend mit Äthanol-Aceton (1:4, v/v) behandelt. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer bei höchstens 37 ^{o} C eingedampft und das zurückgebliebene lipoidhaltige Material ("Gesamtkonjugate") sodann einer ersten Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G

im Lösungsmittel n-Heptan-Äther (1:1) (= System 1) zugeführt. Im Dünnschichtscanner Berthold LB 2720 (Lab. Prof. Berthold, Wildbad) ließen sich nach Bebrütung mit freiem Dehydroepiandrosteron (DHEA) drei radioaktive Abschnitte feststellen, deren RF-Werte bei 0,00 (= A), 0,12 (= B) und 0,45 (= C) lagen (Tabelle II). Diese Fraktionen wurden mit Methanol und Methanol-Äther 1:3 eluiert und durch erneute Dünnschichtchromatographie weiter gereinigt:

Fraktion A auf Ecteola-Cellulose (Macherey & Nagel, Düren) in 1,0 M Acetatpuffer pH 4,75 (= System 2) und die DHEA-Sulfat entsprechende Fraktion schließlich auf Kieselgel G in Methanol-Chloroform-Ammoniak 10:20:0,2 (= System 3).

Fraktion B auf Aluminiumoxyd G (Woelm, Eschwege oder Merck, Darmstadt) in Cyclohexan-Butylacetat-Butanol 50:45:5 (= System 4).

Fraktion C auf Kieselgel G (Merck, Darmstadt) in Hexan-Äther-Methanol-Essigsäure 90:20:3:2 (= System 5).

Die bei dieser zweiten Dünnschichtchromatographie von C auftretende radioaktive Zone mit einem RF-Wert von 0,34 wurde eluiert und das im Eluat enthaltene lipophile DHEA-Konjugat mittels

Tabelle II: Wanderungsgeschwindigkeit von Dehydroepiandrosteron (DHEA), DHEA-Sulfat und lipophilem DHEA-Konjugat bei Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Systemen.

System	DHEA	DHEA-Sulfat	lipophiles DHEA-Konjugat
1	0,12	0,00	0,45
2	0,00	0,14	0,00
3	0,79	0,38	0,85
4	0,49	0,00	0,78
5	0,11	0,00	0,34

Äthylacetat-Schwefelsäure oder Äthylacetat-Perchlorsäure solvolysiert. Im Anschluß an die Reinigung der organischen Phase durch Waschen mit 0,5 N NaOH und Wasser wurde der Rückstand in System 4 chromatographiert. Von den drei anfallenden radioaktiven Fraktionen mit den RF-Werten 0,00 (= C1), 0,49 (= C2) und 0,78 (= C3) hydrolisierte man die mengenmäßig überwiegende, lipoidhaltige Fraktion C3 durch 20 Minuten langes Kochen unter Rückfluß in Methanol-Salzsäure 9:1, reinigte das Hydrolysat in üblicher Weise und chromatographierte den Rückstand nochmals in System 4. Die beiden radioaktiven Abschnitte

mit den RF-Werten 0,50 und 0,78 wurden eluiert und ebenso wie alle übrigen isolierten Fraktionen durch Messung der in aliquoten Teilen enthaltenen Radioaktivität mittels eines Packard Tricarb Spektrometers 314 EX quantitativ erfaßt.

Die Aufarbeitung der Inkubate mit Natrium- 7α-^{3}H-DHEA-Sulfat geschah in ähnlicher Weise. Da die Radiochromatogramme nach der ersten Dünnschichtchromatographie der gesamten Konjugatfraktion im Bereich der lipophilen Steroidkonjugate keine erkennbaren Mengen an Radioaktivität aufwiesen, wurden die entsprechenden Abschnitte (= C) lediglich eluiert und direkt im Packard Tricarb Spektrometer analysiert. Die Fraktion der Steroidsulfate (= A) dagegen chromatographierte man nochmals in System 3, eluierte die DHEA-Sulfat entsprechenden Abschnitte (= A-1) und bestimmte die nach Solvolyse und Dünnschichtchromatographie in System 4 erhaltenen Mengen von freiem DHEA.

Schema zur chemischen Aufarbeitung

Inkubat

Abtrennung der korpuskulären Elemente

Extraktion mit Chloroform -------- freie Steroide 1/10 [xx]

Ausfällen des Eiweißes mit Äthanol-Aceton

Konjugate --------- 1/10 [xx]

wiederholte Chromatographie der Konjugate [x] ----- 1/10 [xx]

Solvolyse

wiederholte Chromatographie der
freien bzw. freigesetzten Steroide
zur Charakterisierung [x] ------ [xx]

---

[x] Lokalisation der Chromatogrammabschnitte
im Dünnschichtscanner

[xx] Quantitative Messung der Radioaktivität
im Szintillationsspektrometer

III. Ergebnisse

Die Gesamtausbeute (Mittel der Doppelversuche an Radioaktivität in den Fraktionen freier und konjugierter Steroide belief sich bei Inkubation von Vollblut auf 78, 5 % und bei Bebrütung von Plasma auf 84,8 % eingesetzter Radioaktivität. Demgegenüber betrug die Wiederauffindungsrate radioaktiven Materials nach Inkubation von Vollblut oder Plasma mit Natrium-7α-^{3}H-DHEA-Sulfat nur 69,6 % bzw. 65,9 %.

Tabelle III: Ausbeute an lipophilen Steroidkonjugaten in % der eingesetzten Radioaktivität beim Meerschweinchen.

	Substrat	A	B	C	D	E
Blut	7α-^{3}H-DHEA	1,745	0,466	0,323	0,189	-
Plasma	7α-^{3}H-DHEA	1,537	0,298	0,226	0,119	-

A nach DC in System 1

B nach DC in System 5

C nach DC in System 4 durch Solvolyse nicht spaltbar

D nach DC in System 4 durch Hydrolyse spaltbar

E nicht hydrolisiert

Tabelle IV: Ausbeute an lipophilen Steroidkonjugaten in % der eingesetzten Radioaktivität beim Menschen.

	Substrat	A	B	C	D	E
Blut	7α-^{3}H-DHEA	2,229	2,051	1,576	1,382	0,151
Plasma	7α-^{3}H-DHEA	3,607	3,018	2,419	2,063	0,191
Blut	7α-^{3}H-DHEA-Sulfat	0,009	-	-	-	-
Plasma	7α-^{3}H-DHEA-Sulfat	0,007	-	-	-	-

In Tabelle III und IV ist die Ausbeute an lipophilen Steroidkonjugaten in % der eingesetzten Radioaktivität wiedergegeben. Nach der ersten Dünnschichtchromatographie, die bereits eine eindeutige Trennung in hydrophile und lipophile Steroidkonjugate erlaubt, finden sich nach Inkubation von freiem DHEA mit menschlichem Vollblut bzw. Plasma 2,2 bzw. 3,6 % der eingesetzten Aktivität in der lipophilen Fraktion. Die entsprechenden Werte liegen bei der Inkubation mit Meerschweinchenblut bzw. -plasma bei 1,7 bzw. 1,5 % (Kolonne A). In den folgenden Kolonnen B - E sind die entsprechenden Prozentzahlen nach Reinigung und Identifizierung durch Solvolyse und Hydrolyse aufgezeigt. Die hier-

bei in Erscheinung tretende Abnahme der Aktivität ist durch methodischen Verlust zu erklären und hält sich im Rahmen der bisherigen Erfahrungen.

Es stellte sich dabei heraus, daß die lipophilen Steroidkonjugate nur zu einem geringen Prozentsatz durch Solvolyse zu spalten waren, wie dies in vollständiger Weise von den Sulfatidylsteroiden bekannt ist. Der Großteil der lipophilen Steroidkonjugate war erst mit Hilfe drastischer Hydrolyse zu spalten.

Bei der Inkubation von DHEA-Sulfat mit menschlichem Blut bzw. Plasma ließen sich nur geringste Mengen an lipophilen Konjugaten nachweisen, die eine weitere Differenzierung unmöglich machten.

Im Verlauf der weiteren Identifizierung der Sulfate erwiesen sich sämtliche Sulfatfraktionen als vollständig solvolysierbar. Die durch Extraktion gewonnene Fraktion der freien Steroide enthielt über 90 % unverändert verbliebenes DHEA, daneben aber noch weitere 7 Metaboliten, unter anderem Androstendiol, die aber im übrigen nicht näher charakterisiert wurden.

IV. Diskussion

Die Bedeutung des Blutes für die Hormone ergibt sich aus der Definition des Hormonbegriffes. Im wesentlichen handelt es sich dabei um ein Transportmedium (35), das den Wirkstoff von der Bildungsstätte zum Wirkungsort befördert. Gleichermaßen bedeutsam für den Hormonhaushalt ist die Tatsache, daß das Blut die in der Peripherie entstandenen Abbauprodukte den Ausscheidungsorganen zuführt oder aber biologisch noch aktive Stoffe den abbauenden Geweben, z.B. der Leber überbringt (35).

Entsprechend den chemischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen, etwa hinsichtlich der Löslichkeit in Wasser, spielen hier die verschiedenen Blut- bzw. Plasmafraktionen eine bedeutsame Rolle. Dies gilt insbesondere auch für die Steroidhormone, bei denen ein charakteristisches Verteilungsmuster innerhalb der einzelnen Plasmaproteinfraktionen gefunden wurde. Es handelt sich hierbei stets um sehr lockere Bindungen, die jederzeit reversibel sind. Inwieweit hierbei eine Schutzfunktion gegenüber metabolischen Einflüssen seitens der Blutfermente vorhanden ist, läßt sich an dieser Stelle nicht entscheiden.

Die og. Proteinsteroidkomplexe scheinen im Blut weitgehend unspezifischer Natur zu sein. Dies geht aus der Tatsache hervor, daß bei den Proteinbindungsreaktionen zur quantitativen Bestimmung einzelner Steroide Kreuzreaktionen mit anderen Steroiden, aber auch mit chemisch vollkommen andersartigen Substanzen, die Ergebnisse verfälschen können. Inwieweit sich eine größere Spezifität der Proteinsteroidbindung durch Verwendung zellständiger Proteine erreichen läßt, kann heute noch nicht beantwortet werden. Erste Hinweise bestehen jedoch für diese Annahme in Bezug auf die Östrogene, deren Bindung in Proteinfraktionen von Endometriumpräparaten spezifischer ist als jene an Plasmaproteine (1, 2, 6, 9, 31, 35).

Große Bedeutung ist der Tatsache beizumessen, daß das Blut in seiner Gesamtheit entsprechend der Konzentration eines Hormons ein mehr oder minder großes Reservoir für den betreffenden Stoff darstellt: Es ist somit die Möglichkeit gegeben, daß kleinere Schwankungen von Produktion und Abbau nivelliert werden können. Andernfalls wäre es denkbar, daß es im Zuge der Regelmechanismen zu einem Aufschaukeln kleiner Schwankungen bis zu extremen Werten kommen könnte. Neben der Transportfunktion kommt dem Blut also auch eine Pufferfunktion zu.

Grundsätzlich ist in Erwägung zu ziehen, ob nicht etwa im Blut selbst metabolische Schritte vorgenommen werden können. Wie anfangs erwähnt wurde, zeichnete sich bei verschiedenen Tierexperimenten tatsächlich bereits im Blut ein quantitativ bedeutsames Stoffwechselgeschehen ab. So konnten nach kurzzeitiger Inkubation verschiedener Steroide mit Frischblut einzelne Konjugate und Metaboliten isoliert werden. WEINAND et al. (34) sind der Ansicht, daß zumindest beim Meerschweinchen Konjugation und Metabolismus von DHEA im Blut eine hervorragende Bedeutung haben.

Im Falle der vorliegenden Untersuchungen sollten weniger quantitative als qualitative Aussagen gemacht werden. Quantitative Aussagen im Sinne der Stoffwechseldynamik ließen sich lediglich unter Einbeziehung des Zeitfaktors machen. Die in dieser Arbeit angeführten Ergebnisse lassen nur bedingte Schlußfolgerungen hinsichtlich der Menge konjugierter bzw. metabolisierter Steroide zu, da einmal die Zeitabhängigkeit nicht untersucht wurde; zum anderen sind wegen der aufwendigen Aufarbeitung, die für eine eindeutige Charakterisierung der gefundenen Substanzen nötig war, größere Verluste anzunehmen.

Unter den hier aufgeführten Ergebnissen besitzt das Auftreten von lipophilen Steroidkonjugaten besondere Bedeutung. Waren bisher lediglich Leber und Nebennierenrinde als Bildungsstätten der Sulfatide einigermaßen bekannt, so wurde hier die Bestätigung für die Richtigkeit der Befunde von WEINAND et al. (34) erbracht, daß auch das Blut in der Lage ist, Sulfatide zu bilden, wenn auch der größte Teil der hier gefundenen lipophilen Verbindungen sich von den bisher beschriebenen Sulfatiden dahingehend unterscheidet, daß zu ihrer Spaltung die Solvolyse in Perchlorsäure-Äthylacetat nicht ausreicht. Bei der Frage nach der Natur dieser Konjugate wäre in erster Linie an Phosphatidylsteroide zu denken, wobei der letzte Beweis noch aussteht. Desgleichen bleibt die Frage nach der physiologischen Bedeutung dieser Verbindungen offen.

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, läßt sich den einzelnen Konjugaten durchaus eine spezifische Bedeutung zumessen. Die Glucuronoside dienen in erster Linie der Inaktivierung und Ausscheidung von Steroiden. Den Sulfaten kann man je nach Natur des konjugierten Steroids eine metabolische oder exkretorische Funktion zuordnen. In metabolischer Hinsicht trifft dies für DHEA und Androstendion zu, in exkretorischer Hinsicht für Androsteron, Ätiocholanolon u.a. Die Bedeutung der

lipophilen Sulfokonjugate kann heute in Richtung Transportform auf vaskulärer, aber auch zellulärer Basis interpretiert werden.

Über die lipophilen Phosphokonjugate ist weder in metabolischer noch in exkretorischer Hinsicht, noch im Hinblick auf ein Transportgeschehen eine Aussage möglich. Dasselbe gilt für neuere Konjugate, bei denen Steroide an Aminosäuren bzw. Nucleoside gekoppelt sind (13).

In jedem Fall ist aber zu fordern, daß diesem Umstand bei entsprechenden Untersuchungen, wie etwa bei Organperfusionen mit Steroiden im Vollblut, in qualitativer und quantitativer Hinsicht Rechnung getragen wird.

V. Zusammenfassung

Bei Perfusionsversuchen an der Meerschweinchenleber mit DHEA und seinen Konjugaten konnte gezeigt werden, daß bereits im Infusatblut in beträchtlichem Maße Metabolismus und Konjugation von Steroiden stattfand. Um diesen Befund zu überprüfen und die Natur der hierbei entstandenen Konjugate näher zu definieren, wurden Inkubationsversuche mit 7α-^{3}H-markiertem DHEA und dessen Sulfat in Vollblut und Plasma von Mensch und Meerschweinchen durchgeführt. Hierbei konnte die Bildung lipophiler Steroidkonjugate nachgewiesen werden. Dem Verhalten in der wiederholten Dünnschichtchromatographie sowie dem chemischen Verhalten bei der Solvolyse gemäß, handelte es sich bei diesen Komplexen vornehmlich um Substanzen, die den sog. Sulfatidylsteroiden nicht entsprechen. Vielmehr liegt die Annahme nahe, daß hierbei Phosphatidylsteroide gebildet wurden. Metaboliten des DHEA wurden nur zu ganz geringem Teil nachgewiesen. Über die Bedeutung der genannten Phosphatidylsteroide kann zur Zeit nichts Näheres ausgesagt werden.

VI. Schrifttum

1. ALBERGA, A. und ROCHEFORT, H.: Nuclear estradiol binding proteins in the uterus.
Int. Study Group f. Steroid Hormones,
IV. Meeting, Rom, 8.-10.12.1969.

2. BREUER, J. und BREUER, H.: Comparative studies on the binding of testosterone and oestradiol-17ß by plasma proteins in normals and in patients with liver cirrhosis.
Int. Study Group f. Steroid Hormones,
IV. Meeting, Rom, 8.-10.12.1969.

3. BÜHNER, P.; RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Wirkung von Gonadotropinen auf die Nebennierenrinde.
Endokrinologie 51: 303-305 (1967).

4. DOCUMENTA GEIGY: 7. Auflage, 1968, S. 424.

5. EBERSOHL, C.; RINDT, W. und OERTEL, G.W.: Wirkung von Gonadotropinen auf die Nebennierenrinde. Endokrinologie 52: 63-69 (1967).

6. JUNGBLUT, P.W.: Binding of steroids by tissue proteins. Int. Study Group f. Steroid Hormones, IV. Meeting, Rom, 8.-10.12.1969.

7. KAISER, E. und RINDT, W.: Milz und Endokrinium. Med. Klinik 60: 985-988 (1965).

8. KAISER, E. und RINDT, W.: Die Rolle der Milz im endokrinen Geschehen. Endokrinologie 49: 69-74 (1965/66).

9. KING, R.J.B.: Nuclear oestradiol-binding and protein phosphorylation. Int. Study Group f. Steroid Hormones, IV. Meeting, Rom, 8.-10.12.1969.

10. KNAPSTEIN, P.; RINDT, W.; TREIBER, L. und OERTEL, G.W.: Enterohepatischer Kreislauf von C-19-Steroiden. II. Rekonjugation von 7α-^{3}H-DHEA-

-^{35}S-Sulfat und 7α-^{3}H-DHEA-^{14}-C-Glucuronosid in Dünndarm und Leber des Meerschweinchens.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 346: 192-197 (1966).

11. KNAPSTEIN, P.; TREIBER, L.; WENDLBERGER, F. und OERTEL, G.W.: Metabolismus und Rekonjugation von 7α-^{3}H-Androstendion, 7α-^{3}H-Androstenolon und 7α-^{3}H-Androstenolon-sulfat in der menschlichen Darmwand in vivo.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 348: 401-404 (1967).

12. KNAPSTEIN, P.; STRAUSS, G.; WENDLBERGER, F. und OERTEL, G.W.: Direkter Metabolismus von i.v. injiziertem DHEA-7α-^{3}H-sulfat-^{35}S am Ende der normalen Schwangerschaft.
Acta endocrin. 58: 261-263 (1968).

13. KUSS, E.: Neue Metabolite des Östradiols 17ß.
15. Symp. Dtsch. Gesellsch. Endokrinol., Köln, 6.-8.3.1969.

14. MAAS, H.; BRÄNDLE, W. und HENTIG, v., O.: Die Hemmung des Übertritts von der G_1- in die DNS-Synthesephase im Endometrium der Ratte nach Progesteron.
37. Tagung Dtsch. Gesellsch. Gynäkol., Travemünde, 24.-28.9.1968.

15. NEISER, J.; RINDT, W.; KNAPSTEIN, P. und OERTEL, G.W.: Freie und konjugierte Steroide in Plasma, Galle und Harn beim Meerschweinchen nach Gabe von ^{3}H-markiertem DHEA, DHEA-Sulfat und DHEA-Sulfatid.
Europ. J. Steroids 1: 15-27 (1966).

16. OERTEL, G.W.: Synthese von Sulfatidyl-dehydroepiandrosteron.
Naturwiss. 48: 621 (1961).

17. OERTEL, G.W. und KAISER, E.: Über Steroid-Konjugate im Plasma. III. Quantitative Bestimmung unpolarer Konjugate in menschlichem Plasma.
Clin. Chim. Acta 7: 463-467 (1962).

18. OERTEL, G.W.: Über Steroidkonjugate im Plasma. X. Biosynthese eines lipophilen Dehydroepiandrosteron-Konjugates.
Biochem. Z. 339: 125-134 (1963).

19. OERTEL, G.W. und GROOT, K.: Über Steroidkonjugte im Plasma. XV. In-vivo-Biogenese von C-19-Steroid-Sulfatiden.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 341: 204-214 (1965).

20. OERTEL, G.W.; GROOT, K. und WENZEL, D.: on lipophile steroid conjugates. I. In vivo experiments with a biosynthetic lipophile dehydro-epiandrosterone conjugate.
II. In vivo biogenesis of oestrogens from biosynthetics dehydroepiandrosterone conjugate.
Acta endocr. (Kbh.) 49: 525-532 (1965, und 533-540 (1965).

21. OERTEL, G.W. und GROOT, K.: Über Steroidkonjugate im Plasma. XIII. Isolierung, Eigenschaften und Zusammensetzung eines biosynthetischen

lipophilen Dehydroepiandrosteron-Konjugates. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 341: 1-9 (1965).

22. OERTEL, G.W.; GROOT, K. und BRÜHL, P.: Über Steroidkonjugate im Plasma. XIV. Zur Bindung von sulfokonjugierten Steroiden an Plasmaproteine. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 341: 10-21 (1965).

23. OERTEL, G.W.; KNAPSTEIN, P.; RINDT, W. und TREIBER, L.: Biogenesis and metabolism of DHEA-sulfatid. IInd Int. Congr. Hormonal Steroids, Milan 1966.

24. OERTEL, G.W. und RINDT, W.: On lipophile C-19-steroidconjugates. IInd Symp. Steroid Hormones, Ghent 1965; Excerpta med. Found., Int.Congr.Series 101: 192-198 (1966).

25. OERTEL, G.W.; TREIBER, L. und RINDT, W.: Direct aromatization of C-19-steroid-sulfates. Experientia 23: 97-99 (1967).

26. OERTEL, G.W.; WENDLBERGER, F.; MENZEL, P.; TREIBER, L. und KNAPSTEIN, P.: Biosynthesis of steroid hormones in human gonads. III. In-vivo-perfusion of the testis with DHEA-sulfate. Europ. J. Steroids 2: 299-316 (1967).

27. RAYNAUD-JAMMET, C.: Action of oestradiol in vitro: Increase in ribonucleic acid biosynthesis in uterine nuclei.
Int. Study Group f. Steroid Hormones, IV. Meeting, Rom, 8.-10.12.1969.

28. RINDT, W.: Persönliche Mitteilung.

29. RINDT, W.; MENZEL, P. und OERTEL, G.W.: Leberperfusion beim Meerschweinchen mit DHEA-Sulfat und DHEA-Sulfatid.
Steroidologia (im Druck).

30. RINDT, W.; BRAUNBERGER, G.; MENZEL, P. und OERTEL, G.W.: Steroidhormone beim Meerschweinchen. Steroidologia (im Druck).

31. STEGGLES, A.W.; VERTES, M.; MARTIN, L. und KING, R.J.B.: A 4 S oestradiol-binding protein in uterine stroma that is controlled by endogenous hormones. Int. Study Group f. Steroid Hormones, IV. Meeting, Rom, 8.-10.12.1969.

32. TRAMS, G.; BREWITT, A. und MAAS, H.: Die Wirkung von Progesteron auf die RNS-Synthese im Rattenuterus. 37. Tagung Dtsch. Gesellsch. Gynäkologie, Travemünde, 24.-28.9.1968.

33. TRANEKJER, A.S.; RINDT, W.; BRACHETTI, A. und HAMANN, A.: Zur Frage der spezifischen Beeinflussung von Primärexplantaten von Corpuscarcinomen durch Gestagene. Zbl. Gynäk. (im Druck).

34. WEINAND, K.; RINDT, W. und OERTEL, G.W.: In vivo-Perfusion der Meerschweinchenleber mit DHEA und seinen Sulfokonjugaten. Endokrinologie 50: 145-162 (1966).

35. WESTPHAL, U.: General aspects of steroid-protein interaction. Int. Study Group f. Steroid Hormones, IV. Meeting, Rom, 8.-10.12.1969.

Herrn Prof. Dr. med., Dr. phil. Dipl. Chem. W. Zimmermann danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes in Homburg.

Für die Überlassung des Themas und die freundliche Anleitung danke ich Herrn Prof. Dr. G. W. Oertel.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Rindt für die hilfreiche Unterstützung und Anleitung beim experimentellen Teil der Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Alimamy Wurie, wurde am 31.7.1928 als Sohn der Eheleute Ahmed Wurie und seiner Frau Fatmatta, geb. Tucker, in Freetown, Sierra Leone, geboren.

Ab 1935 besuchte ich vier Jahre lang die Volksschule in Bo, Sierra Leone und ging dann für weitere vier Jahre in der gleichen Stadt zum Gymnasium. Nach meinem Abschlußexamen (Cambridge School Leaving Certificate) nahm ich eine Beschäftigung als Assistent eines Archäologen (Prof. Kenneth L. Little) an, der die Stammessitten meiner Heimat erforschte.

Nach dieser Zeit entschied ich mich für ein Hochschulstudium in den USA, das ich noch im gleichen Jahr am Hampton Institute in Virginia begann. Im Jahre 1952 erhielt ich dort den B.Sc. degree. In den folgenden Jahren führte ich mein Studium der Naturwissenschaften an der Howard Universität (1952-1953), an der Universität von Wisconsin (1953-1956) und an der New York Universität (1956-1958) fort.
1958 kam ich nach Deutschland. Im Sommersemester 1958 studierte ich Medizin an der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg. Zum Wintersemester 1959 ging ich dann an die Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes in Homburg-Saar und bestand mein Physikum im Sommersemester 1960. Zu Beginn des Sommersemesters 1962 studierte ich drei klinische Semester an der Ruprecht-Karl-Universität in Heidelberg.
Ab dem Wintersemester 1963 studierte ich wieder an der Universität des Saarlandes und legte am 13.4.1965 in Homburg die ärztliche Prüfung ab.

Nach zwischenzeitlicher Tätigkeit in der Endokrinologischen Abteilung am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes in Homburg arbeitete ich ab 1.7.1965 in der Chirurgischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Saarbrücken, ab 1.5.1966 in der Univ.-Frauenklinik Homburg und ab 1.9.1966 in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Völklingen.

Meine Approbation erhielt ich am 14.4.1967. Danach begann ich meine Facharztausbildung für Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Völklingen (Chefarzt Dr. E. Höer).